

# 日生研おより

第70巻 第3号(通巻632号) 2024年(令和6年)7月

## 挨拶・巻頭言

リスク

..... 安齊 了 (2)

## レビュー

*Rhodococcus equi* の宿主感染機構の解明

..... 角田 勤 (3)

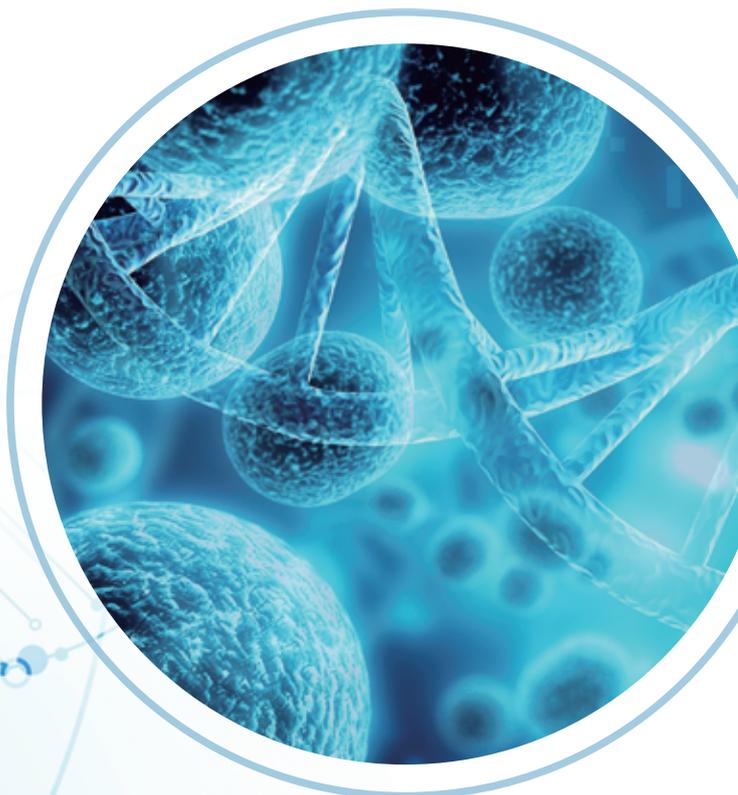
鶏伝染性喉頭気管炎 (ILT) の現状と  
近年の研究傾向について

..... 貴井 涼平 (8)

## おしらせ

研修者・見学者受入状況 ..... (13)

2024年度定時評議員会開催 ..... (14)



## リスク

安齊 了

機能性表示食品による健康被害が大きな問題となっています。この原稿を書いている時点では「製薬会社が製造した機能性表示食品の一部製品を摂取した複数の人に死亡例や入院例を含む腎炎が認められ、原材料である紅麴の製造過程で腎炎をもたらす物質が混入もしくは生合成されたことが疑われている」と報道されています。真の原因は未だ不明ではあるものの、疫学的な観点からは特定の製品ロットと腎炎との間には因果関係がある様です。

消費者庁のHPによると、機能性表示食品の安全性は「安全性の評価」「衛生管理体制の整備」「連絡先の表示」により確保されているとのこと。しかしながら、国は事業者から提出された書類の体裁や表示を確認するだけであり、製品自体の検査は行っていません。この事件を受けて、国も機能性表示食品の安全性について再検討を行うとのことですが、時すでに遅し、被害に遭った方やそのご親族にとっては命や健康が奪われた許し難い事件になってしまいました。製薬会社にとっても、企業としての信頼性が大きく傷つき、莫大な額の補償も待ち受けていることでしょう。私を含めた多くの消費者は、この“錠剤の形をしたサプリメント”について、効果はともかく安全性は保障されているものと思っただけです。

リスクという言葉は、“将来のいずれかの時において何か悪い事象が起こる可能性”という意味で、ビジネスをはじめ一般的に広く使われています。将来起こる可能性ですから、そのことへの対応は予防的であり、想定される事象の大きさに加えて起こる確率を含めて考えることとなります。難しいのは、“一旦起これば重大なことになるかもしれないが起こる可能性は極めて低いと考えるリスク”への対応です。滅多に起こらないであろうリスクに手間や資金をかけることが人間の心理として難しいのは、残念ながら東京電力福島第一原子力発電所の津波対策がその例でしょう。今回の紅麴問題もまた、そのひとつの例になってしまうのかもしれませんが、しかしながら、人の命や健康にかかわることは一旦起こればその後どれだけの対応をしても取り返しはつきません、事後に責任を果たすことの出来ないリスクは確実に存在しています。重大なリスクは発生頻度の高低に係わらず見逃さないようにし、起こるはずないと思ひ込むことなく、その対応策を講じることが、リスク管理上きわめて重要と思われれます。それが社会全体に及ぶものであれば、なおさらです。

一方で、“リスクを取る”ことが必要な場面にも私たちはしばしば遭遇します。特に研究や開発の仕事をしている人にとって、リスクを取るという考え方は避けて通れないのではないのでしょうか。大きな目標に向かおうとする時、その過程には大小様々の何かしら不確定要素が存在するものです。それは無駄や遠回りだけではなく、自分自身や組織に悪い事をもたらす可能性なのかも知れません。それでもリスクを覚悟して思い切って挑むことは、時に必要です。それが自分だけで解決可能であれば、なおさらです。そうすることで、想像した以上の成果がもたらされ、成功の大きな喜びにも繋がるでしょう。もし上手く行かなかったとしても、そこからの学びや経験が次のステップへと導いてくれるはず。す。

リスクを取って挑戦するためには、リスクへの備えが大切です。想定されるリスクを前もって十分に分析し、特に重大なあるいは取り返しのつかないリスクはそれを回避し、予防や対応が考えられるリスクには予めその策を講じておき、その上で何かしらのリスクを敢えて取って果敢に挑戦する、後で悔いない為には欠かせない考え方だと、私は思っています。

(評議員)

## Rhodococcus equi の宿主感染機構の解明

かく たつとむ  
角田 勤 (北里大学獣医学部獣医衛生学研究室)

### はじめに

*Rhodococcus equi* は、マクロファージ内に寄生する細胞内寄生菌である。異物を排除する機能を有するマクロファージにおいて、菌が直面する環境は極めて過酷であると言える。土壌細菌である *R. equi* がこの過酷な環境を克服し病原性細菌となったのは、病原性プラスミドの獲得というイベントを抜きにして語ることはできない。しかし、単にそのことが *R. equi* を厄介な病原体たらしめているのではないことが少しずつ明らかになってきている。本稿では、*R. equi* の菌としての特性から始めて、病原性プラスミドの疫学、感染のメカニズム等において現在までに得られている知見を紹介し、疾病制御のために何をすべきかを考えていきたい。

### Rhodococcus equi という細菌

ロドコッカス属は、アクチノマイセス目ノカルジア科に属するグラム陽性、非運動性の細菌で、土壌や河川、海洋などの様々な環境に広く分布している。ロドコッカス属の細菌は、複雑な分子を代謝する能力を有することで知られており、医薬品として利用されるステロイドの前駆体やアクリルアミドなど有用な物質を産生し、また、環境汚染により人間の健康へのリスクが懸念される多環芳香族炭化水素やフェノール類などの生物分解、化石燃料の生物脱硫、重金属や色素の生物吸着を通じたバイオ環境浄化に利用可能な菌種を多数含んでいる [1]。ロドコッカス属は、医学・獣医学上重要な病原性細菌を含むマイコバクテリウム属やコリネバクテリウム属、ノカルジア属に近縁で、これまでに 60 種を越える菌種が報告されているが、病原性を示すのは動物の病原体である *R. equi* と植物の病原体である *R. fascians* のみである。従って、*R. equi* は同属の細菌種の中ではかなり「異端な」菌種であるといえる。

環境性のロドコッカス属の菌種 (7~10 Mb) と比較して、*R. equi* のゲノムサイズ (5 Mb) はかなり小さいものの、転写制御関連の遺伝子や分泌蛋白をコードする遺伝子の割合が高く、そのことは、環境から宿主体内といった多様な環境への適応を反映するものと考えられている [2]。*R. equi* は、炭水化物輸送系を有しておらず、炭素源として糖を利用することができない。遺伝子と表現型の解析により、本菌の主要な炭素源は有機酸や脂肪酸であることが示されている。特に、*R. equi* のゲノムには、リパーゼ、脂肪酸  $\beta$  酸化酵素、アシル-CoA 合成酵素、エノイル-CoA ヒドラーゼ/イソメラーゼをコードする遺伝子がそれぞれ 20~50 個見られることから、主に脂質代謝を通してエネルギー産生や有機化合物の合成を行っているものと考えられる。*R. equi* は、環境性ロドコッカス属細菌が保有していない硝酸還元酵素遺伝子 (*narGHIJ*) や一酸化窒素還元酵素遺伝子を保有しており、嫌気呼吸の一つである硝酸呼吸を行う可能性が示唆されているが、嫌気的環境下での *R. equi* の増殖は実験的に証明されていない。

### R. equi による感染症

馬の *R. equi* 感染の最も一般的な臨床症状は、膿瘍を伴う化膿性肉芽腫性気管支肺炎である。通常、ほとんどの子馬は生後 16 週目までに症状を示し、生後 6 ヶ月以上の馬で発症することは稀である。化膿性肉芽腫性腸炎、腸間膜または結腸リンパ節の化膿性肉芽腫性リンパ節炎、滑膜炎、骨髄炎などの肺炎以外の疾患は、肺炎と同時にまたはそれとは関係なく発生することがある。空気中に浮遊する菌による経気道感染が主要な感染経路であるとされているが、病変が消化管に限局した症例もあることや、3 ヶ月齢までの無症候の子馬でも糞便 1 グラム当たり  $10^3$ ~ $10^5$  CFU もの菌を排出することから、経口

感染も通常起きていると考えられる (図1)。含まれる菌数から類推すれば、糞便中の菌は宿主体内で増殖しているものと考えられるが、*R. equi* が偏性好気性の細菌であるとするれば、腸管内腔の低酸素環境で増殖するとは考え難いことから、消化管における感染様式にはまだ不明な点が残されている。

馬以外の動物では、古くから豚の下顎リンパ節の肉芽腫病変部から *R. equi* が分離されることが知られている。山羊では、肝臓、肺、脾臓、腸間膜リンパ節等に播種性の膿瘍が形成されることが報告されている。筆者らは、牛においてもリンパ節炎に加えて、山羊のように多臓器において膿瘍形成が見られた症例を報告した [3]。反芻獣での *R. equi* 感染症は、疾病の発生が散発的かつ限定的であることから、病態の増悪化には宿主の免疫状態の低下などの何らかの素因が関与するものと考えられる。その他の動物では、犬、猫、ラクダ、リヤマ、アルパカ等で感染が見られる。人では HIV 感染などの免疫不全時に感染が生じ、化膿性肺炎や様々な臓器での膿瘍形成、菌血症などの症例が報告されている。

#### 病原性プラスミド獲得による宿主への適応

*R. equi* 感染症に罹患した馬由来の分離株は、接合伝達能を持つ病原性プラスミド (pVAPA) を保有しており、このプラスミドを失うと菌の宿主における病原性はほぼ消失する [4]。一般的な環境の土壌から分離される *R. equi* は、大抵病原性プラスミドを保有していないが、*R. equi* 感染症が常在する牧場の土壌からは病原性プラスミドを保有する株が分離され、高率に分離される牧場ほど疾病発生の頻度が高い傾向が見られる。病原性プラスミド上には病

原性関連蛋白 (Virulence-associated protein; Vap) をコードする遺伝子群があり、これらの遺伝子を含む領域の GC 含量は、プラスミドの他の領域あるいは染色体の GC 含量と明らかに異なっており、pathogenicity island (PAI) として水平伝播したものと思われる [5]。PAI に含まれる遺伝子産物の中で、VapA と呼ばれる蛋白は病原性の発現において最も重要であり、*vapA* の単独欠損でプラスミドの脱落と同程度の弱毒化が生じる [6]。PAI 上には、*vapA* と類似した複数のパラログがコードされており、それらの遺伝子は *vap* ファミリーと総称される。しかし、*vapA* 以外のパラログを欠損させても病原性に明確な影響は見られない [7]。一方、豚・猪の病変部から分離される菌株は、pVAPA とは異なる Vap ファミリーをコードするプラスミド (pVAPB) を保有しており、牛や山羊の分離株はそのいずれとも異なる Vap ファミリーをコードする線状プラスミド (pVAPN) を保有する [8, 9]。興味深いことに、これら3種類の病原性プラスミドを保有する株は宿主域において疫学的に「棲み分け」が見られ (図2)、それぞれの病原性プラスミドの相違は宿主への適応を反映しているものと考えられている。しかし、pVAPA 保有株と pVAPB 保有株を、馬マクロファージまたは豚マクロファージに感染させた実験では、両者ともどちらの細胞でも増殖し、増殖性に差が見られなかった。また、接合伝達を利用して、病原性プラスミドを相互に交換した株でも同様の結果であった [10]。よって、病原性プラスミドによる宿主指向性もプラスミドと染色体の共進化による宿主適応も実験的にはまだ証明されていない。人はこれらの動物とは異なり、これまでに臨床分離株から全ての病原性プラスミドが検出されており、免疫力が

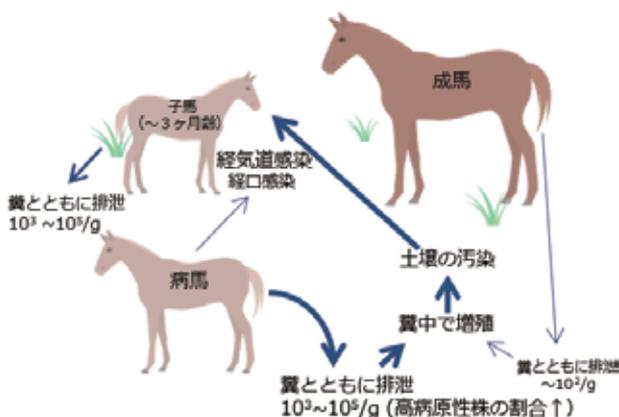


図1 *R. equi* 感染症の感染源と感染経路

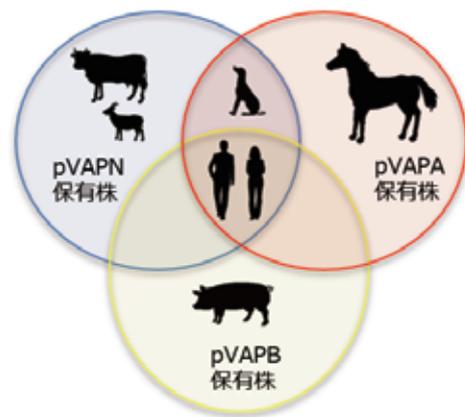


図2 病原性プラスミドの種類と宿主域

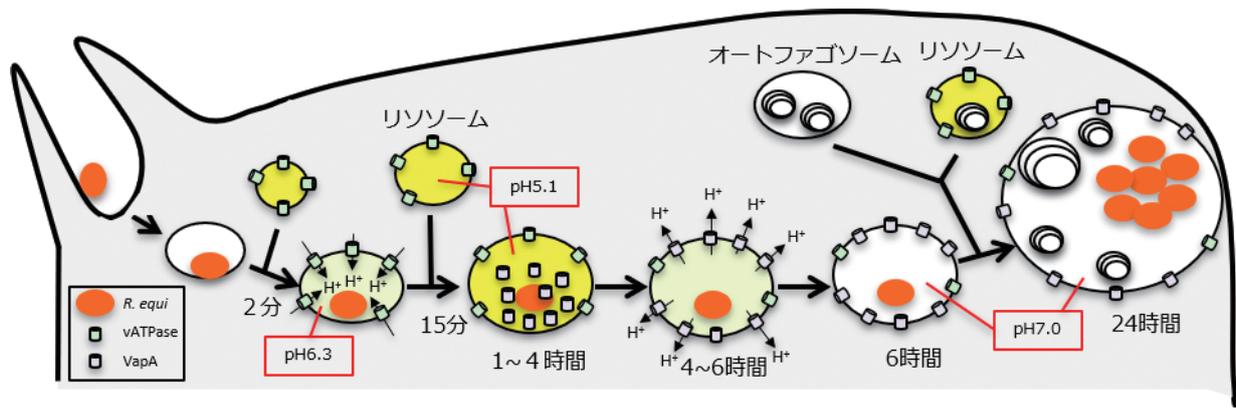


図3 *R. equi* のマクロファージ内生存機構

低下した易感染状態が反映されているものと考えられる。同様の状況が、犬でも報告されており、pVAPA と pVAPN 保有株が分離されている。

### Vap 蛋白の機能

*R. equi* は、近縁の *Mycobacterium tuberculosis* と同様にマクロファージ内で増殖可能な細胞内寄生菌である。*vapA* を欠損させると、この能力は失われ、プラスミド脱落株と同じようにファゴリソソーム内で速やかに殺菌される。マクロファージ内での *R. equi* の増殖機構は以下のように説明される (図3)。*R. equi* を貪食したマクロファージにおいて、*R. equi* を含有する小胞 (RCV) は速やかに vATPase を獲得しながら内腔の pH を低下させる。RCV はその後リソソームと融合し、内腔の pH のさらなる低下が生じる。しかし、この段階で病原性プラスミドを保有する *R. equi* は VapA を産生し、分泌された VapA は RCV 膜に移行して、まだ明らかにはされていないメカニズムでプロトン透過・排出することで内腔の pH を中性域まで回復させる。RCV はその後さらにオートファゴソームやリソソームと融合し、獲得された物質を利用しながら小胞内の *R. equi* は増殖する [11]。

筆者らは、大腸菌組み換え VapA を細胞培養液に加えると、*vapA* 欠損株がマクロファージ内で増殖することを見出した [12]。さらに、病原性プラスミドを脱落させた株においても同様に細胞内増殖が VapA の添加によりレスキューされた。VapA の作用により食胞内の抗菌性の環境が失われた可能性が考えられたため、大腸菌を用いて実験を行ったところ、大腸菌の細胞内増殖は観察されなかった (図4)。

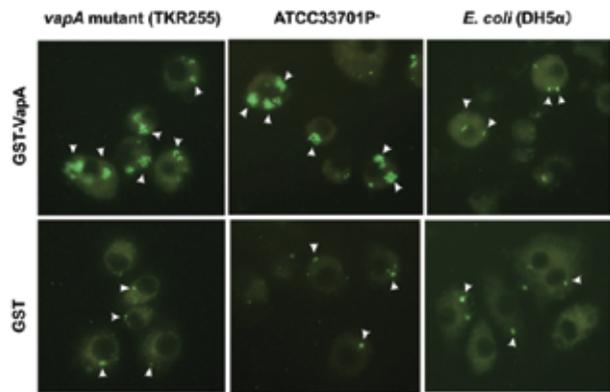


図4 *R. equi* のマクロファージ内増殖における VapA の作用  
 緑色蛍光タンパクを発現する *R. equi* をマクロファージに感染させ、24 時間後に観察した。*vapA* 欠損株 (TKR255) やプラスミド脱落株 (ATCC33701P-) はマクロファージ内で増殖できないが、培養時に GST 融合 VapA を培養上清中に添加すると増殖できるようになる。一方、大腸菌は GST-VapA を添加しても増殖できない。

ロドコッカス属の他の種でも、VapA の存在下で細胞内増殖が調べられたが、増殖性が見られたのは *R. equi* と最も近縁の *R. defluvi* でのみであったと報告されている [11]。これらのことは、*R. equi* は VapA を分泌し、その作用で食胞における殺菌機構を無効化するが、それでも菌が増殖するには依然過酷な環境であり、さらなる適応が必要とされることを示している。*R. equi* の宿主細胞内での増殖に必要なとされる VapA 以外の遺伝子を見出すために、私たちは PCR により同定可能なタグを持つトランスポゾン変異株ライブラリーを作製し、ネガティブスクリーニングによりマウスにおいて感染能の低下した株を選抜することで、感染に関与する遺伝子の同定を行った [13]。その結果、物質輸送、脂質やアミノ酸・有機酸の代謝、DNA 修復、鉄の獲得などに関与する遺伝子が *R. equi* の宿主感染時に必要

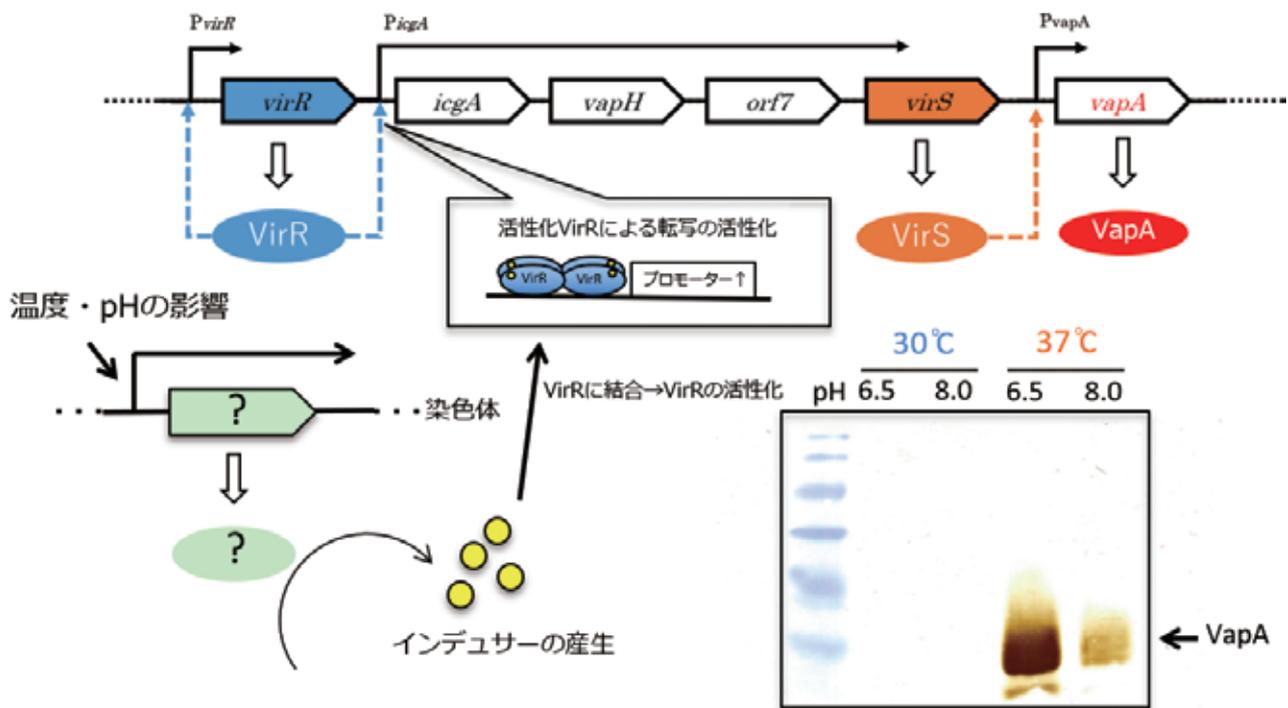


図5 VapAの温度とpHによる制御とそのメカニズム

とされる遺伝子として同定されたが、動物に感染する能力において *R. equi* と近縁の他の種とを分かつ要因を同定するには至らなかった。また、トランスポゾンの挿入部位に偏りが見られたことから、まだ十分な規模のスクリーニングが行えていないことが予想された。私たちは現在、トランスポゾン挿入部位の偏りが小さく、よりハイスループットな *in vivo* スクリーニング法を開発し、感染を成立させる遺伝子の同定を目的とした研究を継続している。その研究成果を基に、マクロファージ内での増殖が適度に減少した変異株を作出することにより、弱毒生ワクチン開発へと繋げていけるものと考えている。

#### VapAの発現制御機構

VapAの発現は、菌を取り巻く環境の温度とpHにより調節される。最大の発現は、37~38℃、pH 6~6.5で生じ、32℃以下では発現は見られない。このことは、VapAの発現は、菌が環境から宿主体内に侵入し、マクロファージに取り込まれて食胞のpHが低下した際に最大となるよう調節されているということを示している。また、*in vitro*の実験で、VapAはマクロファージに対して細胞傷害活性を示すことが観察されている。*R. equi*はpHの上昇につれてVapAの発現量を低下させる応答を起し、必

要以上にVapAを産生しないことで感染マクロファージの生存性を高め、液性免疫や好中球からの隠れ家としてマクロファージを利用しているものと考えられる。筆者らは、VapAの発現がPAI内にコードされるVirRとVirSにより制御されていることを明らかにした[14, 15]。VirRとVirSは共に転写制御因子であるが、VirRはVirSの発現量を調節することでVapAの発現を間接的に制御する(図5)。VirRはLysR型の転写制御因子(LTTR)で、このファミリーの転写制御因子は転写を活性化するためにインデューサーとの結合を必要とする。しかし、インデューサーの産生に関与する遺伝子は病原性プラスミド上にはコードされておらず、おそらく染色体にある遺伝子がそれに関与するものと思われる。したがって、VapAの合理的な発現調節は染色体との協調により可能となったと言える。このことは、病原性細菌の進化を考える上で興味深い例を提示している。前述した感染性に影響を与える遺伝子の網羅的な解析研究から、インデューサーの産生に関与する遺伝子が同定されることが期待される。他の細菌感染症同様、薬剤耐性化の問題は*R. equi*感染症においても懸念されており、抗生物質に代わる*R. equi*治療薬の開発が望まれている。他の細菌では、LTTRのインデューサーのアナログがアンタゴストとして作用する例が報告されており、VirRの活性

化機構とそのインデューサーの解明は、アンタゴストによる転写活性化阻害を作用原理とした抗 *R. equi* 病原性薬の開発に資するものと期待される [16]。

#### 終わりに

これまでの研究で、*R. equi* の病原性発現メカニズムは次第に解明されつつある。しかし、依然として *R. equi* 感染症のコントロールは実現されていない。ワクチン開発の数々の試みが報告されているが、実用的なレベルで効果のあるワクチンはまだない。それには、*R. equi* 感染症が免疫能の未発達な子馬を防御する必要があることと *R. equi* が液性免疫の作用し難い細胞内に寄生する菌であることが大きく関係している。将来、それらの障壁を乗り越えたワクチンの開発が期待されるが、それ以外にも私達が直面する課題は、感染源となる環境中の菌の数を低減することや、効果があるとされる高度免疫馬血漿の作用機序の解明、感染の早期発見のための診断法と有効な治療法の開発、薬剤耐性化に対する備え等多岐にわたる。筆者らの研究室においても現在、それらに対する基礎研究（ワクチン・診断法の開発、バクテリオファージの予防・治療への応用等）が進行中であり、近い将来その成果をご紹介できればと考えている。

#### 引用文献

1. Nazari, M. T., et al., 2022. *Rhodococcus* : A promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants. *J. Environ. Manage.* **323** : 116220.
2. Letek, M., et al., 2010. The genome of a pathogenic *rhodococcus* : cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genet.* **6** (9) : e1001145.
3. Nakagawa, R., et al., 2018. A case report on disseminated *Rhodococcus equi* infection in a Japanese black heifer. *J. Vet. Med. Sci.* **80** (5) : 819–822.
4. Takai, S., et al., 1991. Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* **59** (11) : 4056–4060.
5. Takai, S., et al., 2000. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infect. Immun.* **68** (12) : 6840–6847.
6. Jain, S., et al., 2003. Deletion of *vapA* encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Mol. Microbiol.* **50** (1) : 115–128.
7. Coulson, G. B., et al., 2010. Characterization of the role of the pathogenicity island and *vapG* in the virulence of the intracellular actinomycete pathogen *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* **78** (8) : 3323–3334.
8. Takai, S., et al., 1996. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *J. Clin. Microbiol.* **34** (4) : 1034–1037.
9. Valero-Rello, A., et al., 2015. An Invertron-Like Linear Plasmid Mediates Intracellular Survival and Virulence in Bovine Isolates of *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* **83** (7) : 2725–2737.
10. Willingham-Lane, J. M., et al., 2016. Influence of Plasmid Type on the Replication of *Rhodococcus equi* in Host Macrophages. *mSphere.* **1** (5) : e00186–16.
11. Haubenthal, T., et al., 2023. Specific preadaptations of *Rhodococcus equi* cooperate with its Virulence-associated protein A during macrophage infection. *Mol. Microbiol.* **119** (3) : 285–301.
12. Sangkanjanavanich, N., et al., 2017. Rescue of an intracellular avirulent *Rhodococcus equi* replication defect by the extracellular addition of virulence-associated protein A. *J. Vet. Med. Sci.* **79** (8) : 1323–1326.
13. Sangkanjanavanich, N., et al., 2021. Identification of genes required for the fitness of *Rhodococcus equi* during the infection of mice via signature-tagged transposon mutagenesis. *J. Vet. Med. Sci.* **83** (8) : 1182–1190.
14. Kakuda, T., et al., 2014. VirS, an OmpR/PhoB subfamily response regulator, is required for activation of *vapA* gene expression in *Rhodococcus equi*. *BMC Microbiol.* **14** : 243.
15. Kakuda, T., et al., 2015. Transcriptional regulation by VirR and VirS of members of the *Rhodococcus equi* virulence-associated protein multigene family. *Microbiol. Immunol.* **59** (8) : 495–499.
16. Ilangovan, A., et al., 2013. Structural basis for native

agonist and synthetic inhibitor recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator

PqsR (MvfR). *PLoS Pathog.* 9 (7) : e1003508.

## レビュー

# 鶏伝染性喉頭気管炎 (ILT) の現状と 近年の研究傾向について

ぬくいりょうへい  
貫井 涼平

## はじめに

鶏伝染性喉頭気管炎 (Infectious Laryngotracheitis, ILT) はヘルペスウイルス科に属する *Gallid alphaherpesvirus 1* (GaHV-1, 通称「伝染性喉頭気管炎ウイルス (ILTV)」) の感染によって引き起こされる鶏の急性呼吸器感染症である。鶏の病因となるヘルペスウイルスには本ウイルスの他にマレック病 (Marek's Disease, MD) を引き起こすマレック病ウイルス (MDV, GaHV-2) もあるが、ILTV は MDV に比べて細胞随伴性が弱く、細胞外に成熟粒子が多く産生される特徴がある。本病は家畜伝染病予防法において監視伝染病 (届出伝染病) に指定されており、近年の発生件数をみると集計開始当初に比べ大きく減少している (図1) [11]。しかしながら、発生がなくなったわけではなく、現在においても西日本を中心に散発していることが分かる (表1)。発生件数・羽数が急速に減少した要因として、1981年に実用化された接種反応と病原性を軽減した改良型のILT弱毒生ワクチンの普及と飼養衛生管理の向上による成果が大きいと考えられている [10, 13]。本稿では、ILTとワクチンの現状について、ワクチンのメリット及びデメリット並びに海外のワクチン事情を交えて解説する。

## ILTの症状と診断

ILTの症状は特有の「キャッ」という奇声、くしゃみ、重度の開口呼吸などであり、ときに血痰

(図2)の排泄が見られる。また滲出物が気管に詰まることで窒息死する場合もある。剖検所見では気管粘膜の顕著な充出血、水腫性肥厚が認められ、病態の進行とともに気管内に黄褐色の粘液が貯留しチーズ様の凝固物 (図3)となる。病理組織学的検査では喉頭や気管の粘膜上皮細胞に核内封入体や合胞体の形成がみられる (図4)。ILTは疫学調査や臨床検査に加え、発育鶏卵や培養細胞によるウイルス分離又は病理組織学的検査によって診断される。また、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によるILTVに特異的な遺伝子の検出やPCR産物の制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) による野外株とワクチン由来株の識別も行われている [14]。しかしながらILTVの遺伝子は70以上あり、どの遺伝子を標的として識別するのが適当なのか現在も議論されており、複数の遺伝子領域に対してPCRが実施されているのが実情である [8]。

## ILTワクチンの現状と課題

我が国で生ワクチンの使用が開始された1970年代は、ワクチンの使用は免疫を賦与する一方で、投与鶏に結膜炎や喉頭気管炎が見られるなどワクチン株に病原性がかなり残っていることが問題視されていた。そのため、1979年に鶏病研究会から発表された「伝染性喉頭気管炎の防疫指針」において、ワクチンの使用範囲や使用上の注意が提言された [12]。現在、我が国で使用されているILT弱毒生

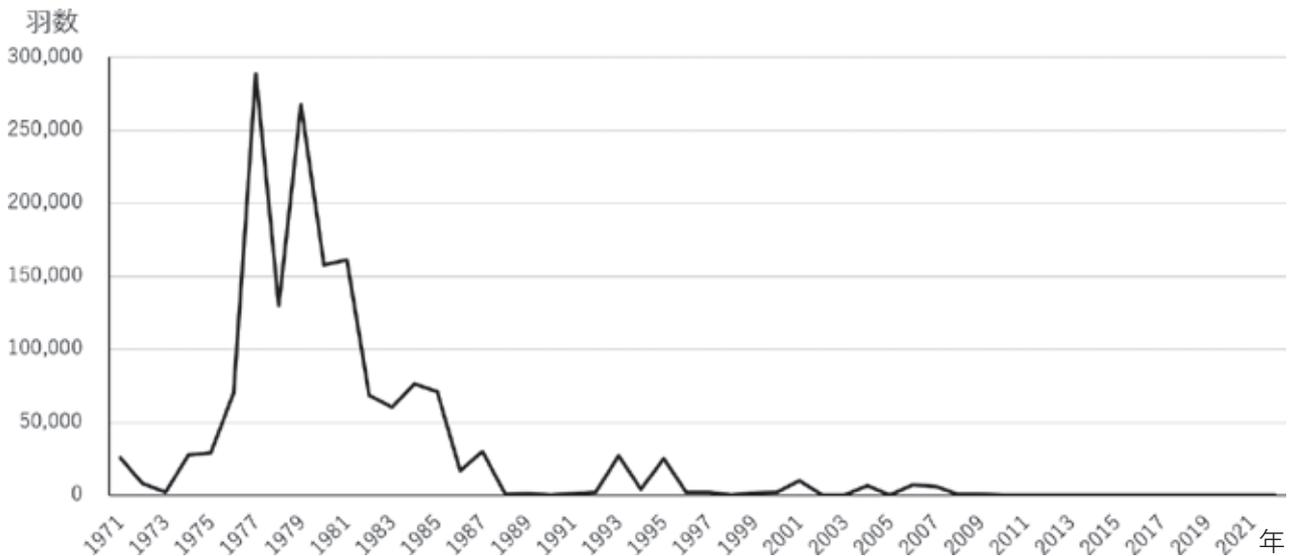


図1 我が国におけるILTの発生羽数

表1 2019~2023年のILT発生府県と発生戸数及び羽数

府県	ILT発生	
	戸数	羽数
青森	2	8
岩手	8	51
秋田	1	4
山形	1	3
栃木	1	3
岐阜	1	20
愛知	1	5
京都	2	5
兵庫	2	4
島根	2	9
広島	7	28
山口	2	6
熊本	4	15
大分	3	9
鹿児島	4	10
合計	41	180

ワクチンは培養細胞馴化由来 (tissue-culture-origin, TCO) であり、その病原性の減弱から初期に使用されていたワクチンと比較して安全なワクチンと考えられている。海外ではTCO-ILT弱毒生ワクチンの他に鶏胚馴化由来 (chick-embryo-origin, CEO) ILT弱毒生ワクチンが市販されており、飲水やスプレーによる投与が可能であるなどのメリットがあるためILT流行地で使用されている。しかしながらCEO-ILT弱毒生ワクチンには病原性復帰の可能性を疑う事例が報告されており [6]、我が国に

おいてCEO-ILT弱毒生ワクチンは認可されていない。

TCO-ILT弱毒生ワクチンにおける最大の課題は投与方法である。多くの鶏用生ワクチンは飲水あるいは噴霧投与など省力的な投与方法が承認されているが、当該ワクチンでは個体毎の保定が必要な点眼及び点鼻投与方法のみが用法となっている。特に大型化が進む近代養鶏においては点眼又は点鼻投与によるワクチン接種は作業者にかかる負担が非常に大きく、生産性のコストに大きく影響する。さらに、従来からILTによる被害の多くは採卵鶏であったが、近年は肉用鶏における発生も懸念されている。平飼い環境で飼育されている肉用鶏を対象にワクチンを点眼又は点鼻投与することは実質不可能であるため、実用的な投与方法の確立が強く求められている。

#### 近年の国内における発生事例

近年におけるILTは散発的な発生に止まっているものの、一度発生すると斃死率の上昇等による被害のほか農場の清浄化に時間がかかるなど農場にとって大きな損害をもたらすことから、現在でも対策を怠ってはならない鶏病の1つである。近年の発生例として岩手県でのILT発症事例 (岩手県県北家畜保健衛生所より提供) を紹介する。

2022年9月、約23万羽を飼養する採卵鶏の育成農場において、12棟中1棟の鶏群 (88日齢) で開口呼吸などの呼吸器症状の発現とともに死亡羽数が増加したため、同日、管轄の家畜保健衛生所により病性鑑定が実施された。当該農場では通常ILT弱

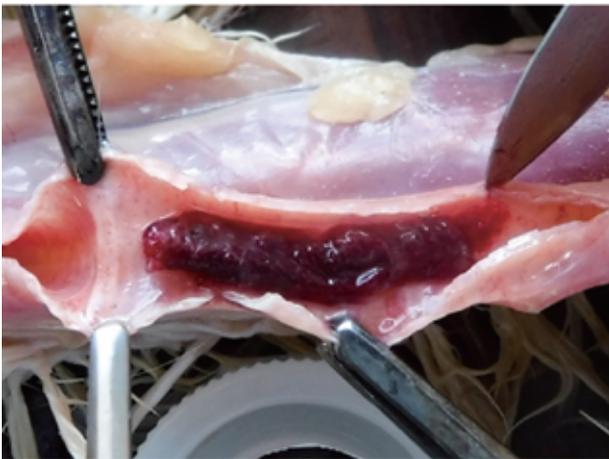


図2 ILTV感染鶏にみられた気管内の血痰

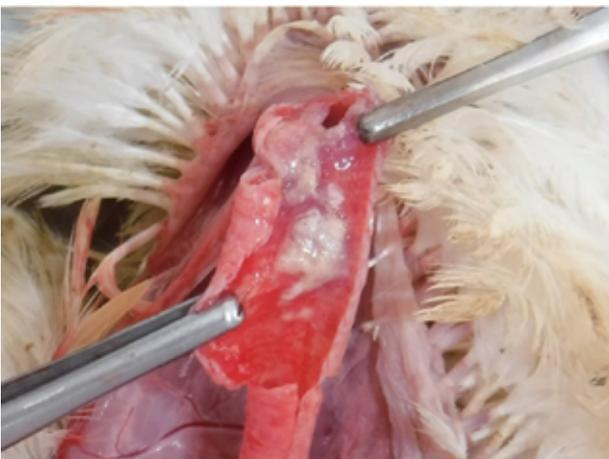


図3 ILTV感染鶏にみられた気管内のチーズ様貯留物

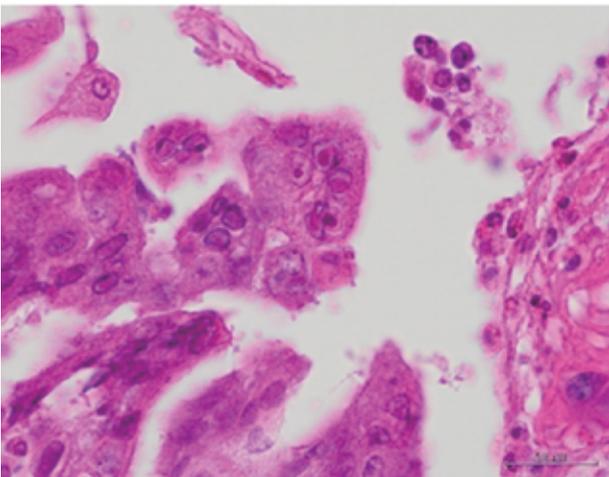


図4 ILTV感染鶏にみられた気管粘膜の核内封入体及び合胞体形成

毒生ワクチンを使用していたが、発症鶏群は未接種であった。緊急的に当該鶏群にILT弱毒ワクチンを点眼接種した結果、発生から約2週間後に本病は沈静化した。その後、当該農場から10 km圏内の周辺農場においても5例の発生（同年10月に55日齢肉用鶏、同年11月に445日齢採卵鶏及び41日齢

肉用鶏、同年12月に47日齢肉用鶏及び99日齢採卵鶏）がみられた。聞き取り調査により、12月に発生した採卵鶏以外の農場はいずれもILT弱毒生ワクチンは未接種であることが判明した。発症鶏の病性鑑定により、多くの事例に共通して気管内に血痰及び粘液の貯留（図2）やチーズ様物の貯留（図3）などの肉眼所見が認められた。病理組織学的検査では、喉頭、気管、肺に核内封入体を伴う粘膜上皮細胞の合胞体が認められた（図4）。ウイルス学的検査では、発症鶏及び死亡鶏の全羽の気管からILT遺伝子が検出され、数羽からILTが分離された。分離されたILTに対してICP4遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRを行い、得られた増幅DNAについて3種類の制限酵素HaeIII、MspI、HhaIによるRFLP解析を行った。その結果、分離ウイルスは市販ワクチン株と同様の切断パターンを示し、ワクチン株に近縁な野外株であると推測された。最初に発生した採卵育成農場では一部の鶏群でワクチンが未接種であったことから、今回の発生要因としては、何らかの原因で侵入したウイルスが免疫を持たない鶏群の間で増幅し発症に至ったものと考えられた。また、4農場から分離されたILTのRFLPは全て同じ切断パターンを示したことから、これらは同一起源のウイルスが野生動物等により伝播したものと推察された。今回の事例では、ILT弱毒生ワクチンで免疫されていない鶏群で継続的な発生がみられたことから、本病の予防には適切なワクチン接種が重要であることが改めて認識された。

#### 近年のILT研究の傾向

世界的な近年のILTに対する研究は、組換え（ベクター）ワクチンに関する報告が多い[3]。その理由としてやはりILTワクチンの投与方法にあると考えられる。肉用鶏におけるILTの発生は世界的にも問題であり[2,9]、その対策として既存ワクチンの点眼投与による予防は現実的ではないため、卵内接種（*In ovo*）若しくは初生ひなへの皮下接種（*s.c.*）が可能なベクターワクチンの研究及び開発が盛んに行われている[5]。

ILT遺伝子を組込むベクターウイルスとして鶏痘ウイルス（Fowl Poxvirus, FPV）又は七面鳥ヘルペスウイルス（turkey herpesvirus, HVT）が使用さ

れている。ILTV のゲノムは **unique long** 領域 (UL) と **unique short** 領域 (US) という逆向き対称な配列を有する [7]。UL32 遺伝子はウイルス膜関連タンパク質をコードしている領域であり、**glycoprotein** (糖タンパク質) である **gB**、**gD**、**gI** はそれぞれ UL27、US6、US7 遺伝子によりコードされている。これらの遺伝子がベクターウイルスに挿入された組換えベクターワクチンが、現在海外では実用化されている。

第 1 世代のベクターワクチンは **rFPV/ILT** (ILTV 遺伝子を挿入した遺伝子組換え **FPV**) ワクチンであり、第 2 世代の **rHVT/ILT** (ILTV 遺伝子を挿入した遺伝子組換え **HVT**) ワクチンは 2000 年代初頭に導入された。SPF 鶏に **rHVT/ILT** ワクチンを卵内接種又は初生時に皮下接種したところ、4、7 及び 10 週齢において攻撃後の臨床症状発現に対する防御効果が認められた。また、**rHVT/ILT** ワクチンを卵内接種した肉用鶏においても、21 日齢時攻撃で 67%、35 日齢時攻撃で 87% の防御効果が認められ、ベクターワクチンであっても防御能を賦与できることが確認された。**rHVT/ILT** ワクチンは、臨床症状の軽減、体重増加の維持、ウイルス排出の軽減において、**rFPV/ILT** ワクチンよりも有効であることが示されており、これは **rFPV** が種鶏からの移行抗体の影響を受けやすいことが原因だと考えられている [3]。

一方、**rHVT/ILT** ワクチンにはデメリットも存在する。ILT 弱毒生ワクチンは投与後まもなく細胞性免疫を惹起するが、**rHVT/ILT** ワクチンによる防御能の賦与は生ワクチンと比較して数週間遅れることが報告されている。この場合、前述の岩手県の発生事例のような **ILT** 発生後の緊急的なワクチン投与の実施は困難になる。また、**rHVT/ILT** ワクチンは **CEO-ILT** 弱毒生ワクチンと比較して攻撃ウイルスの排出を減少させるが、気管内におけるウイルス複製を抑制できなかったとの報告もある。肉用鶏を用いた研究では、**rHVT/ILT** ワクチン接種により攻撃 **ILTV** の複製は減少したものの、ウイルスを排出し非免疫の同居鶏に感染させていたことが実証されている。このことから、流行地域では **rHVT/ILT** ワクチンを接種された鶏群が不顕性感染となりウイルスを環境中に排出し、それが野外ウイルスの循環に寄与している可能性が示唆された [3]。

各々のワクチンのデメリットを補うため、ワクチンの併用に関する研究も行われている。**CEO-ILT** 弱毒生ワクチンは国内で用いられていないが、**TCO-ILT** 弱毒生ワクチンと比較して免疫原性が高いという特徴がある。SPF の初生ひなに **rHVT/ILT** ワクチンを皮下投与し、その後 6 週齢で **CEO-ILT** 弱毒生ワクチンを接種すると、生ワクチンウイルスの伝播が抑制され、**rHVT/ILT** ワクチンを単独で接種した場合よりも、臨床症状及びウイルス排出に対する防御効果が向上した [4]。また、肉用鶏の初生ひなに **rFPV/ILT** ワクチンと **rHVT/ILT** ワクチンを皮下接種したところ、**CEO-ILT** 弱毒生ワクチンと同様に減耗率や増体などの生産成績が向上し、攻撃試験時の臨床症状、気管病変、及びウイルス増殖の抑制が認められた [3]。

ベクターワクチンによる免疫の持続性については、SPF 鶏における **rHVT/ILT** ワクチンの初生皮下接種で 60 週齢 (420 日齢) まで抗体の産生が認められている。**rHVT/ILT** ワクチンを採卵鶏の初生ひなに皮下接種した場合においても、産卵ピークを過ぎた 35 週齢時での攻撃に対して防御効果が認められた。さらに、**rHVT/ILT** ワクチン初生接種後の 4 週齢で **TCO-ILT** 弱毒生ワクチンを接種した場合、防御効果は 74 週齢まで延長したことが報告されている [3]。

最近、ベクターワクチンと国内でも使用されている **TCO-ILT** 弱毒生ワクチンの併用による防御効果に関する論文が発表された [1]。初生時の **rHVT-ND-ILT** (**ILTV** 遺伝子と **NDV** (ニューカッスル病ウイルス) 遺伝子を挿入した遺伝子組換え **HVT**) ワクチンの接種に続き、10 週齢で **TCO-ILT** 弱毒生ワクチンを点眼接種し、**rHVT-ND-ILT** ワクチン及び **TCO-ILT** 弱毒生ワクチンをそれぞれ単独で接種した群とともに 15 週齢で強毒 **ILTV** による攻撃試験を行った。攻撃後の斃死の阻止は **rHVT-ND-ILT** ワクチンと **TCO-ILT** 弱毒生ワクチンの併用群でのみ認められ、臨床症状及び気管におけるウイルスの増殖は、併用群と **TCO-ILT** 弱毒生ワクチン単独接種群で有意に減少した。攻撃ウイルスの増殖を評価するため、攻撃後の各群に健康鶏を導入しウイルス伝播の有無を調べたところ、**rHVT-ND-ILT** ワクチン単独接種群及び **TCO-ILT** 弱毒生ワクチン単独接種群の導入鶏では感染が認められたのに

対し、両ワクチン併用群の導入鶏では感染が確認されなかった。これらの結果から、rHVT-ND-ILT ワクチン及び TCO-ILT 弱毒生ワクチンを併用することにより ILTV に対する防御効果が増強され、野外ウイルスの排出を阻止できる可能性が示された。

### おわりに

我が国では「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」により遺伝子組換え生物や遺伝子組換え技術を用いたワクチンの製造及び使用は厳密な管理が必要であるため、当該ワクチンの一般化へのハードルは未だ高い。また、ベクターワクチンの使用対象は最終的に畜産製品となることから、生産者はもとより販売業者や消費者の理解を得ることも必要である。さらに、ワクチンの開発費や製造コストがかかるような場合はワクチン価格が高騰し、かえって現場で採用しにくくなる可能性も考えられる。このような問題が克服され、ベクターワクチンが適正に使用可能となれば ILT ワクチンの課題である「接種労力」及び「肉用鶏での使用」をクリアできるのではないかと考えられる。現在、国内における ILT は TCO-ILT 弱毒生ワクチンの使用等によって抑えられており、その発生報告は少ない。しかしながら、いつ流行してもおかしくない状況であり、一度発生すると被害が甚大となる疾病の一つであることを決して忘れてはならない。

### 謝辞

ILT 発症事例の写真等資料をご提供いただきました岩手県北家畜保健衛生所に深く御礼申し上げます。

### 引用文献

1. Becerra, R., Maekawa, D., and García, M. 2023. Protection Efficacy of Recombinant HVT-ND-LT and the Live Attenuated Tissue Culture Origin Vaccines Against Infectious Laryngotracheitis Virus When Administered Individually or in Combination. *Avian Dis.* **67** (23) : 145-152.
2. Crespo, R., Woolcock, P. R., Chin, R. P., Shivaprasad, H. L., and García, M. 2007. Comparison of Diagnostics Techniques in an Outbreak of Infectious Laryngotracheitis from Meat Chickens. *Avian Dis.* **51** (4) : 858-862.
3. Hein, R., Koopman, R., García, M., Armour, N., Dunn, J. R., Barbosa, T., and Martinez, A. 2021. Review of Poultry Recombinant Vector Vaccines. *Avian Dis.* **65** (3) : 438-452.
4. Maekawa, D., Riblet, S. M., Newman, L., Koopman, R., Barbosa, T., and García, M. 2019. Evaluation of vaccination against infectious laryngotracheitis (ILT) with recombinant herpesvirus of turkey (rHVT-LT) and chicken embryo origin (CEO) vaccines applied alone or in combination. *Avian Pathol.* **48** (6) : 573-581.
5. Maekawa, D., Riblet, S. M., Whang, P., Alvarado, I., and García, M. 2021. A Cell Line Adapted Infectious Laryngotracheitis Virus Strain (BAORFC) for *in ovo* and Hatchery Spray Vaccination Alone or in Combination with a Recombinant HVT-LT Vaccine. *Avian Dis.* **65** (3) : 500-507.
6. Oldoni, I., and García, M. 2007. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathol.* **36** (2) : 167-176.
7. Spatz, S. J., Volkening, J. D., Keeler, C. L., Kutish, G. F., Riblet, S. M., Boettger, C. M., Clark, K. F., Zsak, L., Afonso, C. L., Mundt, E. S., Rock, D. L., and Garcia, M. 2012. Comparative full genome analysis of four infectious laryngotracheitis virus (Gallid herpesvirus-1) virulent isolates from the United States. *Virus Genes.* **44** (2) : 273-285.
8. Thureen, D. R., and Keeler, C. L., Jr. 2006. Psittacid Herpesvirus 1 and Infectious Laryngotracheitis Virus: Comparative Genome Sequence Analysis of Two Avian Alphaherpesviruses. *J Virol.* **80** (16) : 7863-7872.
9. Vagnozzi, A., Zavala, G., Riblet, S. M., Mundt, A., and García, M. 2012. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathol.* **41** (1) : 21-31.

- 10. 井土俊郎. 2009. 伝染性喉頭気管炎とその予防対策における問題点. *鶏病研報*, **45** (2) : 65-72.
- 11. 監視伝染病の発生状況、農林水産省消費・安全局動物衛生課  
([https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/kansi\\_densen.html](https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html))
- 12. 鶏病研究会. 1979. 伝染性喉頭気管炎の防疫指針. *鶏病研報*, **15** (3) : 95-96.
- 13. 中井正久. 1982. 新たに開発した ILT ワクチンの性格とその応用. *鶏病研報*, **18** (増) : 43-49.
- 14. 山崎憲一, 永井寿宗, 太田秀幸, 河合透, 本田隆. 2010. 2005~2008 年に九州 5 県の鶏伝染性喉頭気管炎 (ILT) 発症鶏から分離された ILT ウイルスの性状. *鶏病研報*, **46** (2) : 100-106.  
(日生研株式会社)

お知らせ

研修者・見学者受入状況 (2023 年 4 月から 2024 年 3 月)

来所日・期間		所属機関・人数	研修・見学内容
2023 年	7 月 7 日	JICA 研修員及び同行者 7 名	施設見学
	9 月 19 日	農研機構・動物衛生研究部門 1 名	施設見学
	12 月 12 日	KAICO 株式会社 3 名	施設見学
	12 月 18 日	順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科 2 名	施設見学
2024 年	1 月 11 日	日本大学生物資源科学部獣医学科 1 名	施設見学
	1 月 16 日	東京農工大学獣医学科 1 名	施設見学
	2 月 19 日	日本獣医生命科学大学獣医学科 1 名	施設見学
	3 月 11 日~15 日	VPcamp (岩手大学共同獣医学科 1 名、岐阜大学共同獣医学科 2 名、宮崎大学農学部獣医学科 2 名) 5 名	インターンシップ

## 2024 年度定時評議員会開催

当研究所の2024年度定時評議員会が、去る2024年6月20日に開催され、2023年度の事業報告及び決算報告が承認されると共に、次期の評議員、理事及び監事が選任されました。現在の評議員、理事及び監事は下記のとおりです。

### 1. 評議員

あんざい とおる は が たけし しげかね けんじ やまそぼ たつや おかだ のぶひこ  
安齊 了 芳賀 猛 重金 堅治 山唄 達也 岡田 信彦

### 2. 理事・監事

氏名	役職	担当
ながい しんや 長井 伸也	理事長	経営統括
すぎうら かつあき 杉浦 勝明	所長	研究及び検査
つちや こうたろう 土屋 耕太郎	常務理事	経営企画
りん しほう 林 志鋒	常務理事	管理
ただき まこと 唯木 誠	監事	
しゅつう いちじろう 朱通 市次郎	監事	



—— テーマは「生命の連鎖」——  
生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)  
(通巻632号) 令和6年6月25日印刷 令和6年7月1日発行(第70巻第3号)  
発行所 一般財団法人日本生物科学研究所  
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1  
TEL: 0428(33)1520(経営企画部) FAX: 0428(31)6166  
URL: <https://nibs.or.jp>  
発行人 土屋耕太郎

編集室 委員/高井亮輔(委員長)、河島奈悠、伊藤宗磨  
事務/経営企画部

印刷所 株式会社 精興社  
(無断転載を禁ず)